

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-301631

(43)Date of publication of application : 14.11.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/53

G01N 37/00

(21)Application number : 06-117488

(71)Applicant : TDK CORP

(22)Date of filing : 06.05.1994

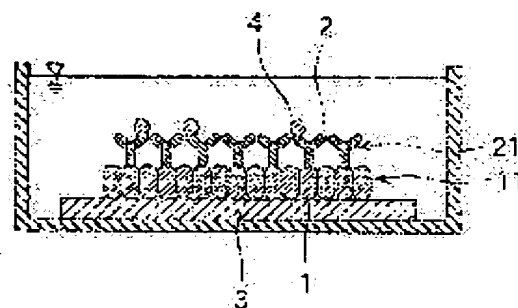
(72)Inventor : AIZAWA MASUO

## (54) MOLECULE COUNTING METHOD

## (57)Abstract:

PURPOSE: To enable the number of molecules to be measured by a simple method in the measurement of mass utilizing specific binding such as the reaction of antigen and antibody.

CONSTITUTION: A monomolecular film 11 including carrier molecules 2 (antibody molecules or the like) specifically bindable to counted object molecules 4 (antigen molecules or the like) is formed, and the carrier molecules 2 and the counted object molecules 4 are bound on one face side of the monomolecular film 11. The corrugation of the monomolecular film 11 on the bound face side of the counted object molecules 4 is then measured using an inter-atomic energy microscope or the like to count the counted object molecules 4. A monomolecular film 21 including carrier molecules 2 (immuno globulin G molecules or the like) is formed adjacently to the substrate monomolecular film 11 including molecules 1 (protein A molecules or the like) bindable to the carrier molecules 2, and the carrier molecules 2 and the counted object molecules 4 are bound on the surface side of the monomolecular film 21.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.01.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3386883

[Date of registration] 10.01.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第 3 3 8 6 8 8 3 号

(P 3 3 8 6 8 8 3)

(45) 発行日 平成15年3月17日 (2003. 3. 17)

(24) 登録日 平成15年1月10日 (2003. 1. 10)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

S

33/483

33/483

F

33/543

5 0 1

33/543

5 0 1 A

請求項の数 6

(全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-117488

(22) 出願日 平成6年5月6日 (1994. 5. 6)

(65) 公開番号 特開平7-301631

(43) 公開日 平成7年11月14日 (1995. 11. 14)

審査請求日 平成13年1月12日 (2001. 1. 12)

(73) 特許権者 000003067

ティーディーケー株式会社

東京都中央区日本橋1丁目13番1号

(72) 発明者 相澤 益男

東京都杉並区天沼2-19-14

(74) 代理人 100082865

弁理士 石井 陽一

審査官 松本 征二

(56) 参考文献 特開 平5-273212 (J P, A)

特開 平5-23350 (J P, A)

(58) 調査した分野 (Int. Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

G01N 33/48 - 33/98

(54) 【発明の名称】 分子の計数方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 計数対象分子と特異的に結合可能な担体分子を含み、かつ規則性をもった配列の均一性の良好な単分子膜を形成し、次いで、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜の一方の面側において結合させ、次いで、前記単分子膜の前記計数対象分子が結合して得られた面側の起伏を測定することにより、前記計数対象分子を計数することを特徴とする分子の計数方法。

【請求項 2】 前記担体分子が抗体分子または抗原分子である請求項 1 の分子の計数方法。

【請求項 3】 前記単分子膜を、前記担体分子と結合可能な分子を含み、かつ規則性をもった配列の均一性の良好な下地単分子膜に隣接して形成し、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜表面側において結合させる請求項 1 または 2 の分子の計数方法。

2

【請求項 4】 前記下地単分子膜がプロテイン A 分子を含み、前記担体分子が免疫グロブリン G 分子である請求項 3 の分子の計数方法。

【請求項 5】 前記単分子膜の前記計数対象分子が結合して得られた面側の起伏を、原子間力顕微鏡により測定する請求項 1 ~ 4 のいずれかの分子の計数方法。

【請求項 6】 前記下地単分子膜の一方の側に隣接して前記単分子膜を形成した後、少なくとも分子サイズよりも平滑性の良好な表面をもつ基板の表面に、前記下地単分子膜が前記基板側に存在するように、前記下地単分子膜および前記単分子膜を転送し、その後、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜表面側において結合させる請求項 3 ~ 5 のいずれかの分子の計数方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明は、物質の定量において、分子を計数する方法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】抗原や抗体は、蛍光免疫測定法により定量することができるが、蛍光免疫測定法は一般に低感度であり、また、分子単位での定量、すなわち分子の計数は不可能である。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、抗原抗体反応等の特異的結合を利用した物質定量において、簡易な方法で分子数の測定を可能とすることである。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】このような目的は、下記(1)～(6)の本発明によって達成される。

(1) 計数対象分子と特異的に結合可能な担体分子を含み、かつ規則性をもった配列の均一性の良好な単分子膜を形成し、次いで、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜の一方の面側において結合させ、次いで、前記単分子膜の前記計数対象分子が結合して得られた面側の起伏を測定することにより、前記計数対象分子を計数することを特徴とする分子の計数方法。

(2) 前記担体分子が抗体分子または抗原分子である上記(1)の分子の計数方法。

(3) 前記単分子膜を、前記担体分子と結合可能な分子を含み、かつ規則性をもった配列の均一性の良好な下地単分子膜に隣接して形成し、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜表面側において結合させる上記(1)または(2)の分子の計数方法。

(4) 前記下地単分子膜がプロテインA分子を含み、前記担体分子が免疫グロブリンG分子である上記(3)の分子の計数方法。

(5) 前記単分子膜の前記計数対象分子が結合して得られた面側の起伏を、原子間力顕微鏡により測定する上記(1)～(4)のいずれかの分子の計数方法。

(6) 前記下地単分子膜の一方の側に隣接して前記単分子膜を形成した後、少なくとも分子サイズよりも平滑性の良好な表面をもつ基板の表面に、前記下地単分子膜が前記基板側に存在するように、前記下地単分子膜および前記単分子膜を転送し、その後、前記担体分子と前記計数対象分子とを、前記単分子膜表面側において結合させる上記(3)～(5)のいずれかの分子の計数方法。

#### 【0005】

【作用および効果】本発明では、単分子膜中の担体分子(抗体分子等)に計数対象分子(前記抗体分子と特異的に結合する抗原分子等)を結合させ、これによって生じた前記単分子膜表面の起伏を原子間力顕微鏡などを用いて測定することにより、計数対象分子の数を計測する。

【0006】担体分子が単分子膜化しにくい場合、あるいは均一性の良好な単分子膜とすることが困難な場合に

は、下地単分子膜を用いる。下地単分子膜は、担体分子と結合可能、好ましくは特異的な結合が可能な分子であって、しかも均一性の良好な単分子膜とできる分子を含む。この分子に担体分子を結合させることにより、下地単分子膜の一方の面側に、担体分子を含む均一性の良好な単分子膜を容易に形成することができる。

【0007】なお、原子間力顕微鏡、走査トンネル顕微鏡、透過型電子顕微鏡などにより有機化合物の分子認識が可能であることは、知られている(「表面」, Vol. 32, No. 1 (1994)、JOURNAL OF ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUE, 18, 212-222 (1991) 等)。しかし、抗原抗体反応を利用して分子を計数する提案はなされていない。

#### 【0008】

【具体的構成】以下、本発明の具体的構成について詳細に説明する。

【0009】本発明の好ましい態様では、通常、以下に示す手順で溶液中の計数対象分子を計数する。

#### 【0010】① 下地単分子膜

図1(a)に示すように、気相-液相界面において、プロテインA分子1からなる下地単分子膜11を形成する。プロテインA分子が均一性の極めて良好な単分子膜を形成することは、LB(ラングミュア・プロジェット)法を利用して基板表面に転送した下地単分子膜表面の起伏を測定することにより確認できる。図1(b)は、プロテインA分子からなる単分子膜をグルタルアルデヒドで架橋して補強したものの表面の起伏を、原子間力顕微鏡(AFM)により画像化した写真である。図1(b)では、プロテインA分子(径7nm程度)に対応する凸部(明度の高い領域)が規則性をもって配列していることが認められる。

#### 【0011】② 担体分子を含む単分子膜

気相-液相界面に下地単分子膜を形成した後、図2(a)に示すように、計数対象分子(抗原分子)に特異的に結合する担体分子(免疫グロブリンG分子)2を、下地単分子膜11のプロテインA分子1に結合させる。免疫グロブリンG分子は、そのC末端側がプロテインA分子に特異的に結合するため、担体分子2は図示するように下地単分子膜11下面に配列して単分子膜21となる。このようにして担体分子を単分子膜化する方法を、通常、セルフアセンブリ法という。セルフアセンブリ法により均一性の良好な単分子膜が得られることは、上述した下地単分子膜と同様に、担体分子を含む単分子膜表面の起伏を測定することにより確認できる。図2(b)は、プロテインA分子からなる下地単分子膜をグルタルアルデヒドで架橋したものの表面に、セルフアセンブリ法により抗フェリチン抗体分子の単分子膜を形成し、この単分子膜表面の起伏を、AFMにより画像化した写真である。図2(b)では、抗フェリチン抗体分子(径15nm程度)に対応する凸部(明度の高い領域)が規則性をもって配列していることが認められる。

### 【0012】③ 単分子膜の基板表面への転送

下地単分子膜の一方の面側に担体分子を含む単分子膜を形成した後、LB法（通常は水平付着法）を利用して、下地単分子膜および担体分子を含む単分子膜を、下地単分子膜が基板側に存在するように基板表面に転送する。

### 【0013】④ 計数対象分子と担体分子との結合

図3(a)に示すように、下地単分子膜11および単分子膜21を表面に有する基板3を、計数対象分子4を含む溶液に浸漬して、計数対象分子4と担体分子2とを結合させる。この後に単分子膜21表面の起伏を測定すれば、担体分子2に結合している計数対象分子4の有無が分子単位で認識でき、計数対象分子4の数わかる。図3(b)は、図2(b)に示す抗フェリチン抗体分子の単分子膜に、フェリチン溶液を接触させた後の単分子膜表面の起伏を、AFMにより画像化した写真である。図3(b)では、抗フェリチン抗体分子に対応する低い凸部に加え、抗フェリチン抗体分子に結合したフェリチン分子（径10nm程度）に対応する2個の高い凸部が認められる。図3(b)では、2個の抗原分子が異なる抗体分子に結合しているが、1個の抗体分子に2個の抗原分子が結合している場合でも、各抗原分子の識別は可能である。

【0014】上記①～④を、さらに詳細に説明する。

【0015】上記①の下地単分子膜は、前述したように、担体分子を均一性の良好な単分子膜とするために設けられる。下地単分子膜に用いる分子は、担体分子に応じて適宜選択すればよい。

【0016】下地単分子膜は、均一性の高い膜構造とするために1種の分子から構成されることが好ましいが、2種以上の分子を含むものであってもよい。

【0017】下地単分子膜を形成する際の各種条件は、用いる分子に応じて適宜決定すればよい。例えば、プロテインA分子を用いる場合には、通常、水系の溶媒を用いることが好ましい。

【0018】下地単分子膜は、上述したようにグルタルアルデヒド等により補強することができる。

【0019】なお、担体分子単独で単分子膜を形成できる場合、あるいは担体分子を含む分子混合物が単分子膜を形成できる場合には、下地単分子膜を設けなくてもよい。例えば、Thin Solid Films, 202, 151-156(1991)に記載されているように、抗体分子の溶媒に所定濃度の電解質溶液を用いることにより、抗体分子単独で単分子膜を形成することができる。ただし、均一性の良好な抗体単分子膜とするためには、下地単分子膜を利用することが好ましい。

【0020】上記②の担体分子を含む単分子膜は、液相と気相との界面に下地単分子膜が存在している状態で、担体分子を液相中に添加することにより形成できる。担体分子は、通常、溶液として前記液相中に添加される。この単分子膜は、均一性の高い膜構造とするために1種

類の分子だけから構成することが好ましい。例えば、この単分子膜が2種以上の抗体分子を含む場合には、正確な計数が不可能となる場合がある。

【0021】上記③の単分子膜の基板表面への転送に際しては、下地単分子膜が基板に付着できるように、基板材質や付着方法等の各種条件を適宜選択すればよいが、少なくとも分子サイズよりも平滑性の良好な表面をもつ基板を用いることが好ましい。基板としては、例えば、シリコン単結晶、マイカ、グラファイト、Au単結晶などが挙げられる。

【0022】上記④において計数対象分子と担体分子とを結合させる際に、計数対象分子の溶媒は特に限定されないが、下地単分子膜にプロテインA分子を用いた場合には、水系の溶媒を用いることが好ましい。

【0023】担体分子は、上述したいずれかの方法により単分子膜化が可能なものを、計数対象分子に応じて各種抗体や抗原から適宜選択すればよい。

【0024】単分子膜表面の起伏の測定には、例えば各種のスキニングプローブマイクロコピーを利用することができるが、単分子膜表面の起伏の明瞭なイメージが得られること、また、測定に手間がかからず安価で済むことなどから、上述したAFMを用いることが好ましい。AFMは、測定対象と探針との間にはたらく斥力および引力を利用して測定対象の表面形状を測定する手段であり、測定空間を真空とする必要がないため、測定対象の制限が少ない。AFMには、測定対象に探針が接触しながら走査する接触走査型、探針がわずかに接触するタッピングモード方式、探針が接触しない非接触走査型などがあるが、本発明では非接触走査型のものを用いることが好ましい。

【0025】なお、本発明では、AFM以外の手段によるスキニングプローブマイクロコピーを利用することもできる。例えば、走査トンネル顕微鏡(STM)や磁気力顕微鏡(MFM)によっても、単分子膜表面の起伏を測定することができる。

【0026】STMは、探針と対象物との間に流れるトンネル電流を利用して導電性物質の表面形状を測定するため、上記のJOURNAL OF ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUE, 18, 212-222(1991)に示されるように、対象物が導電性をもたない場合には、対象物表面に導電膜を形成する必要があった。しかし、計数対象分子の結合後に単分子膜表面を導電膜で覆うと、計数対象分子の存在による起伏を確認することが極めて困難となり、分子の計数が実質的に不可能となることがわかった。そこで、本発明においてSTMを用いる場合には、単分子膜が形成される側が少なくとも導電性である基板を用い、単分子膜表面、あるいは計数対象分子結合後の単分子膜表面には導電膜を形成せずに、STMによる測定を行なう。導電膜を形成しない場合でも、計数対象分子の存在によりトンネル電流が変化するため、分子の計数が可能である。

【0027】MFMは、探針と対象物との間にはたらく磁気力を利用して磁性体の表面形状を測定するため、計数対象分子に磁性体を結合させることが必要である。通常は、間接蛍光抗体法と同様に、計数対象分子と特異的に結合する分子に磁性体を付加し、この磁性体を付加した分子を、単分子膜の担体分子に結合している計数対象分子に結合させた後、MFMにより検出する。ただし、この方法では、磁性体を付加した分子を作製する工程が必要となり、また、結合反応が1段階増えてしまう。

#### 【0028】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

#### 【0029】プロテインA単分子膜

まず、超純水を用いて、プロテインA水溶液（0.1  $\mu$ g/ml）を調製した。次に、フロムヘルツ型LB膜装置のトラフ水面（表面積150  $\text{cm}^2$ ）上に、マイクロピペットを用いて前記水溶液200mlを展開した。20分間放置後、バリアにより10  $\text{mm}^2/\text{s}$ の速度で圧縮し、表面圧が11N/mとなったところでバリアを固定し、プロテインAの単分子膜を得た。この状態で、0.5%グルタルアルデヒドを含む隣接トラフの水面に、プロテインA単分子膜を10  $\text{mm}^2/\text{s}$ の速度で移動した。1時間反応させた後、隣接する超純水トラフの水面にプロテインA単分子膜を移動して、過剰なグルタルアルデヒドを洗浄除去した。

【0030】次いで、劈開した高配向バイロリティックグラファイト基板（15mm×15mm×2mm）の表面に、プロテインA単分子膜を水平付着法により転送した。

【0031】プロテインA単分子膜を転送した基板を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）中に浸漬し、AFMによりプロテインA単分子膜表面の起伏を画像化した。AFMには、セイコー電子工業株式会社のSFA-300を用いた。設定力は $4 \times 10^{-11}$  Nとし、走査速度は0.6Hzとし、800nm×800nmの領域を走査した。得られたAFM像を図1（b）に示す。

#### 【0032】抗フェリチン抗体単分子膜の積層

前述した方法でプロテインA単分子膜を形成した後、抗フェリチン抗体溶液（フェリチン濃度23ng/mlの10mMリン酸緩衝液）のトラフにプロテインA単分子膜を移動した。1時間後、プロテインA単分子膜を超純水トラフに移動して、非特異的に吸着した抗フェリチン抗体を洗浄除去し、抗フェリチン抗体の単分子膜を得た。次いで、水平付着法により、プロテインA単分子膜が基板側となるように両単分子膜を基板表面に転送し、抗フェリ

チン抗体単分子膜表面の起伏を、前述した方法でAFMにより画像化した。得られたAFM像を図2（b）に示す。

#### 【0033】フェリチンの結合

抗フェリチン抗体単分子膜を転送した基板を、フェリチン水溶液（10ng/ml）中に浸漬して1時間放置した後、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で洗浄した。次いで、抗フェリチン抗体単分子膜の表面を、前述した方法でAFMにより画像化した。ただし、走査領域は100nm×100nmとし、設定力は $2.6 \times 10^{-11}$  Nとした。得られたAFM像を図3（b）に示す。

【0034】前述したように、図1（b）から、プロテインA分子が均一性の良好な単分子膜を形成できることがわかり、図2（b）から、下地としてプロテインA単分子膜を設けることにより、抗フェリチン抗体分子が均一性の良好な単分子膜を形成できることがわかる。そして、図3（b）から、フェリチン分子の数を確認できることが明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

20 【図1】（a）は、下地単分子膜を形成する方法を説明するための断面図であり、（b）は、基板上に形成された微細なパターンを表わす図面代用写真であって、プロテインA分子からなる下地単分子膜表面の起伏を示す原子間力顕微鏡像である。

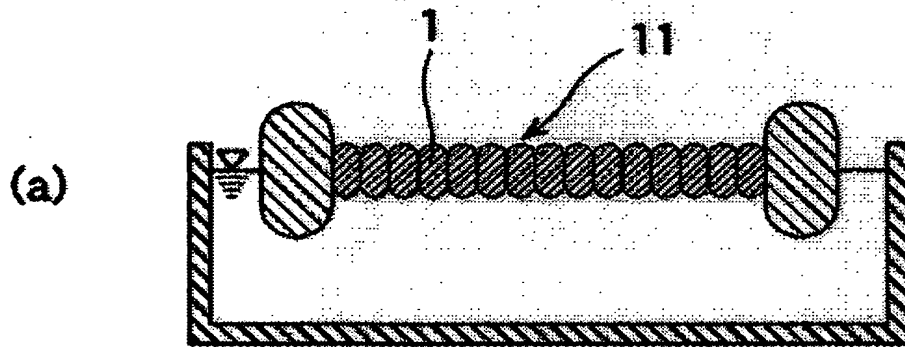
【図2】（a）は、担体分子を含む単分子膜を形成する方法を説明するための断面図であり、（b）は、基板上に形成された微細なパターンを表わす図面代用写真であって、担体分子（抗フェリチン抗体分子）からなる単分子膜表面の起伏を示す原子間力顕微鏡像である。

30 【図3】（a）は、担体分子に計数対象分子を結合させる方法を説明するための断面図であり、（b）は、基板上に形成された微細なパターンを表わす図面代用写真であって、計数対象分子（フェリチン分子）が結合した担体分子を含む単分子膜表面の起伏を示す原子間力顕微鏡像である。

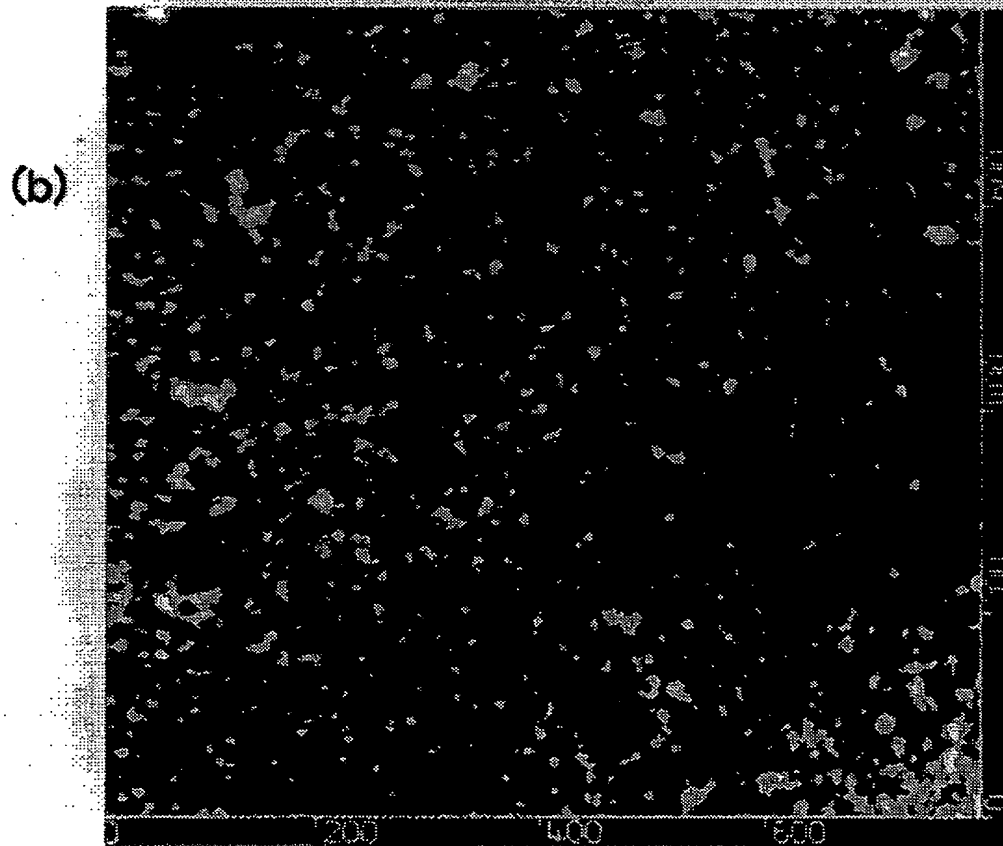
#### 【符号の説明】

- 1 プロテインA分子
- 11 下地単分子膜
- 2 担体分子
- 21 単分子膜
- 3 基板
- 4 計数対象分子

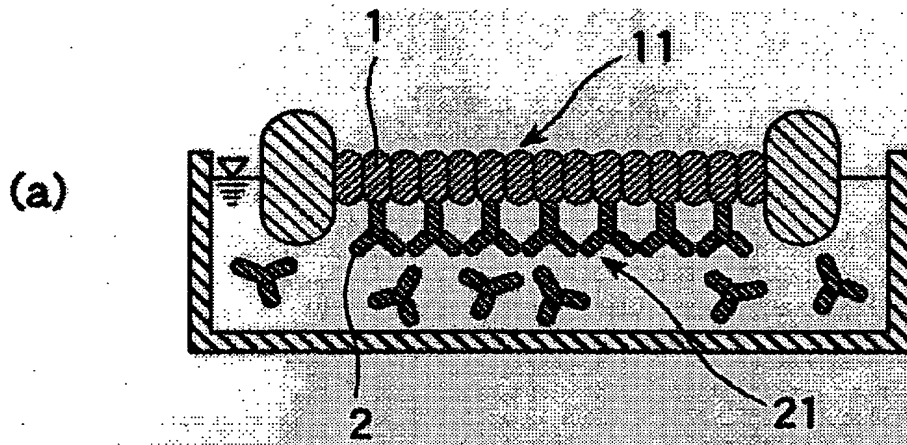
【図 1】



図面代用写真



【図 2】

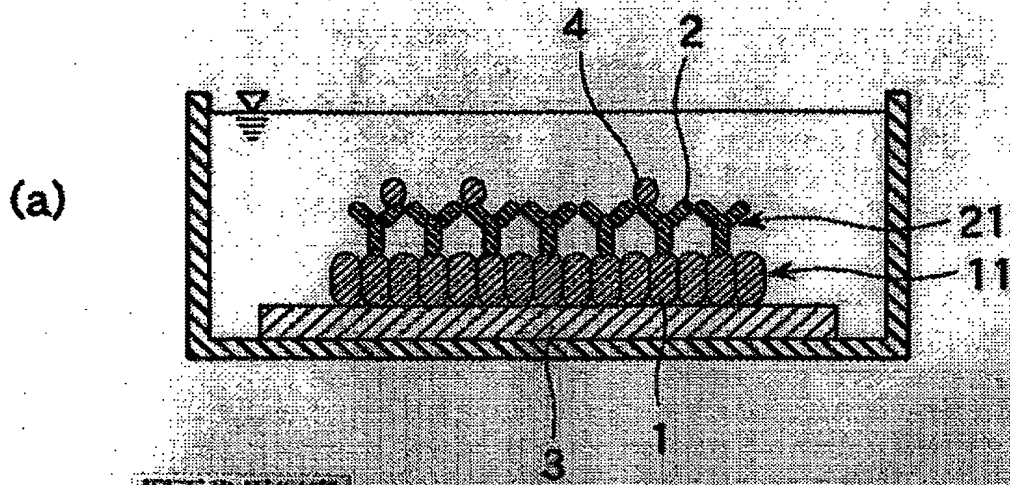


図面代用写真

(b)



【図 3】



図面代用写真

